

Detección de daño del coleóptero *Amblycerus longesuturalis* para la selección y germinación *in vitro* de semillas de Peteribí (*Cordia trichótoma* [Vell.] Arrab. ex Steudel)

Duarte, Evelyn; Maximiliano Acevedo; Pedro Sansberro; Claudia Luna¹

Facultad de Ciencias Agrarias - Universidad Nacional del Nordeste - Instituto de Botánica del Nordeste- CONICET. CC N° 209. Corrientes, Argentina. Tel.: ++54 379 4427589 Int.: 121-146-156. C.P. W3402BKG. ¹cluna@agr.unne.edu.ar; www.ibone.unne.edu.ar

Duarte, Evelyn; Maximiliano Acevedo; Pedro Sansberro; Claudia Luna (2014) Detección de daño del coleóptero *Amblycerus longesuturalis* para la selección y germinación *in vitro* de semillas de Peteribí (*Cordia trichótoma* [Vell.] Arrab. ex Steudel) . Rev. Fac. Agron. Vol 112 (1): 18-27

La presente investigación tuvo como objetivo establecer un método efectivo para detectar los daños producidos por el ataque de un coleóptero (*Amblycerus longesuturalis*) en los frutos completamente desarrollados de *Cordia trichótoma*, que permita seleccionar semillas sanas y/o dañadas para la obtención de plantas. Se hallaron dos métodos efectivos para dicha selección; por un lado el uso de imágenes radiográficas como técnica no destructiva y rápida para el cultivo de frutos con pericarpio y por otro, la técnica de escisión de frutos para clasificar distintos niveles de daño en aquellos desprovistos de pericarpio. Los frutos con semillas sanas o con daño leve, fueron sometidos a tratamientos escarificatorios y saneantes con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) e hipoclorito de sodio (NaOCl) para posteriormente, ser germinados *in vitro*. Si bien, es posible inducir germinación a partir del cultivo *in vitro* del fruto, la remoción del pericarpio promueve el proceso y mejora los indicadores de vigor evaluados. Los mejores resultados se obtuvieron cuando los frutos fueron sometidos a una inmersión en solución acuosa de H₂O₂ 50% durante 3 días, luego transferidos a una solución de NaOCl 2,5% con posterior rescate y cultivo de las semillas; donde el 93,3±6,7% de las mismas germinaron, requiriendo 1,7±0,6 días de incubación para lograrlo, alcanzándose un tiempo medio de germinación (TMG) a los 5,6±0,1 días. La combinación de ambos saneantes permite obtener una óptima desinfección de las semillas para su establecimiento *in vitro*.

Palabras clave: desinfección; establecimiento; vigor; deterioro; imágenes radiográficas.

Duarte, Evelyn; Maximiliano Acevedo; Pedro Sansberro; Claudia Luna (2014) Detection of damage caused by coleopteran species *Amblycerus longesuturalis* for the selection and *in vitro* germination of Peteribí seeds (*Cordia trichótoma* [Vell.] Arrab. Ex Steudel). Rev. Fac. Agron. Vol 112 (1): 18-27

This research aims to set an effective method to detect the damage produced by the attack of a coleopteran (*Amblycerus longesuturalis*) in fully developed fruits of *Cordia trichotoma*, to allow the classification of healthy and damaged seeds for plants production.

Two methods were analyzed for such selection, on one hand the use of radiographic images as a fast and non-destructive technique for the cultivation of fruits, and on the other hand, longitudinal splitting of fruits for classifying different levels of damage in the seeds.

The fruits with healthy or slightly damaged seeds were subjected to scarification and sanitizing treatments with hydrogen peroxide (H₂O₂) and sodium hypochlorite (NaClO) and then germinated *in vitro*. While it is possible to induce germination from *in vitro* cultivation of the fruit, the pericarp removal promotes and enhances the vigor indicators that were evaluated.

The best results were obtained when the fruits were submerged in an aqueous solution of 1.34 M H₂O₂ for 3 days, then transferred to a solution of 2.5% NaClO, to finally perform the rescuing and cultivation of the seeds. With this protocol, 93.3 ± 6.7% of the seeds germinated in 1.7 ± 0.6 days of incubation, with a mean germination time (MGT) of 5.6 ± 0.1 days. The combination of both sanitizing treatments produces the optimal seed disinfection for their *in vitro* establishment.

Key words: Disinfection; establishment; vigor;_deterioration; radiographic images

Recibido: 12/04/2013

Aceptado: 28/01/2014

Disponible on line: 01/04/2014

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

INTRODUCCIÓN

El "Peteribí" (*Cordia trichotoma* Vell. Arrab. ex Steudel) es una especie forestal nativa de Argentina, y se encuentra distribuida en la Selva Misionera y el distrito Oranense de la selva Tucumano-Boliviana (Biloni, 1990; Dimitri, 1998); posee importancia maderera (Salazar et al., 2000) y se la considera desde el punto de vista económico una especie prioritaria para la región nordeste de Argentina (Crechi et al., 2010).

Si bien, su propagación se produce de forma natural por vía sexual, sus semillas pierden viabilidad rápidamente (Fick, 2007) presentando un alto grado de recalcitrancia que dificulta su almacenamiento; posee un fruto drupáceo (Cabrera, 1983; Pérez-Moreau, 1994) o núcula (Fick, 2007), cilindroideo, que al alcanzar la madurez se desprende conservando la corola y el cáliz (Ariza Espinar et al., 2006) que favorecen la dispersión anemócora (de Souza, 2008). La cubierta seminal se encuentra unida a la pared del fruto, por lo que la propia semilla queda unida al mismo por la base del estigma (Ramalho Carvalho, 2002); hecho que dificulta la separación de la simiente sin dejar expuestos los cotiledones replegados de aspecto cerebroide (Ariza Espinar et al., 2006), constituyendo la unidad de dispersión de la especie.

Cabe destacar que esta especie arbórea se constituye como hospedero del coleóptero *Amblycerus longesuturalis* (Pic), ya que estudios previos determinaron que las hembras adultas de *A. longesuturalis*, coleóptero de la familia Bruchidae, ovipositan las semillas de *C. trichotoma*, cuyos estados larvales pueden completar su ciclo hasta madurez a expensas de las reservas cotiledonares (Murruaga de L'Argentier, 1983; Barrance et al., 2003), ocasionando daños severos que determinan la muerte del embrión por lo que afecta seriamente la aptitud de las semillas para su reproducción.

La calidad de las semillas está determinada por diferentes atributos; como la viabilidad, vigor y estado sanitario (ISTA, 2003). Para evaluar y cuantificar la viabilidad se pueden realizar diferentes tipos de test, entre los que destacan: ensayos de germinación y radiografía con rayos X (Rao et al., 2007). Este último es un importante elemento de ayuda para detectar insectos de alimentación interna en semillas (De Tempe, 1961) además de ser un método no destructivo muy útil para el análisis interno de las propiedades de las semillas: anatomía, defectos morfológicos, cambios fisiológicos que ocurren durante la maduración, entre otros. A través de imágenes radiográficas se han identificado propiedades estrechamente relacionadas con la viabilidad y el vigor de las semillas (Belcher & Vozzo, 1979; Simak, 1980; ISTA, 1996).

Por otra parte el uso de las variadas herramientas que ofrece la biotecnología podría constituirse en una alternativa válida aplicable a los planes de mejoramiento y conservación de la especie; sin embargo, la presencia de microorganismos endófitos limita el desarrollo de los sistemas de micropropagación basados en el cultivo de segmentos caulinares, yemas axilares y/o meristemas; siendo éste un hecho común en la mayoría de las especies perennes (Grattapaglia & Machado, 1998). En tal escenario, la obtención de plántulas saneadas mediante la germinación *in vitro* de

semillas podría contribuir a la obtención de explantes libres de organismos contaminantes promoviendo el establecimiento *in vitro* de los cultivos. Para ello, resulta necesario desarrollar por un lado, un procedimiento no destructivo que permita la detección rápida del parásito; y por el otro, un protocolo de desinfección que favorezca el establecimiento y germinación *in vitro* de las semillas a fin de obtener una cantidad suficiente de plántulas que brinde una población homogénea en cuanto a edad y tamaño (Heberle et al., 2010).

Dada la importancia de esta especie, su alto grado de recalcitrancia y sus problemas sanitarios, se considera necesario establecer un protocolo efectivo para la germinación *in vitro* de semillas de *Cordia trichotoma* que permita un óptimo establecimiento de las plantas y mediante el uso de imágenes radiográficas detectar los daños producidos por el ataque del insecto hospedero en los frutos, que al ocasionar una germinación lenta e irregular, dificultan la producción masiva de plantines con fines comerciales.

METODOLOGÍA

Material vegetal

Se recolectaron frutos de *C. trichotoma* durante el mes de junio de 2011 de árboles que crecen en la Reserva de la comunidad aborigen Teko'a Arandú, ubicada en el paraje Pozo Azul del Departamento Eldorado de la Provincia de Misiones (26°20'S y 54°10' W) y que fueron seleccionados por su porte, sanidad, accesibilidad y producción de semillas. Una vez cosechados, los frutos fueron inmediatamente introducidos en bolsas de polietileno y almacenados a 4°C hasta el inicio de los experimentos (4 meses).

Detección y clasificación de daños producidos por *Amblycerus longesuturalis*

A partir de la escisión de los frutos y observación microscópica de las semillas, se elaboró una escala de daños basada en la proporción de tejido lesionado en posición opuesta al embrión. La escala se confeccionó a partir de la observación de tres lotes de 100 semillas cada uno, empleándose un microscopio estereoscópico marca Leica, modelo S6E, equipada con luz de fibra óptica.

Con el propósito de establecer un método de clasificación de frutos no destructivo, el análisis microscópico fue complementado con el uso de rayos X. Las semillas se pegaron a una placa de plástico autoadherible de polipropileno, la que se colocó sobre una placa de acrílico transparente en la cámara de irradiación no digital (Faxitron X-Ray modelo MX-20; Specimen Radiography System®, Illinois, USA) y se sometió a exposiciones a 18 kV por 10 s. Posteriormente, las placas se revelaron en una impresora digital para rayos X (procesador Hope X Ray; Micro-Max modelo 319®).

Para dar precisión al método de Rayos X respecto de un método destructivo; se realizó la Prueba Topográfica por Tetrazolio, que se basa en un cambio de coloración de los tejidos vivos en presencia de una solución de la sal de cloruro de 2, 3,5-trifenil Tetrazolio; se expresa la actividad de las enzimas respiratorias deshidrogenadas en los tejidos vivos de las semillas. Estas enzimas

catalizan la reacción de los iones H^+ liberados por la respiración de los tejidos vivos con la sal de tetrazolio, formando una sustancia estable, no difusible, de coloración rosada – rojiza, denominada trifenil formazan que permite distinguir en las semillas a las áreas vivas (áreas de color rojo) de las áreas muertas que no poseen coloración. Las evaluaciones de vigor pueden hacerse en base a la identificación, localización, y observación de los tejidos de la semilla (Hampton & Tekrony 1995).

Se acondicionaron las semillas realizando una imbibición durante 48 hs. con posterior sumersión en la solución de Tetrazolio para su tinción, utilizando frascos de vidrio de 100 ml con tapa hermética. Estos frascos se incubaron en estufa a 28°C y en oscuridad durante 24 hs. Una vez completada la tinción, las semillas se enjuagaron con abundante agua corriente y se realizaron las observaciones sobre cada semilla individualmente.

Los resultados de ambas pruebas se expresaron aplicando los criterios sugeridos por Mendonça *et al.* (2001) para contar: sin daño/con daño. Las variables se expresaron en porcentaje.

Escarificación y desinfección de semillas

Los frutos fueron sometidos a un pre-tratamiento de escarificado químico mediante imbibición en una solución acuosa de peróxido de hidrogeno (PH) 30 volúmenes en diferentes concentraciones y tiempo de exposición. Seguidamente, éstas fueron sometidas a distintos tratamientos desinfectantes consistentes en la inmersión de las semillas en una solución de etanol (70%) durante 1 min, transferencia a una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) en distintas concentraciones (1,5 y 2,5% cloro activo) y TRITON® (0,1%) durante 20 min en agitación constante (90 r.p.m.). Una vez finalizado el tratamiento de desinfección, los frutos fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril.

Germinación

Los frutos y/o semillas aisladas fueron cultivados individualmente en tubos de vidrio de 15 ml de capacidad conteniendo 4 ml de una solución nutritiva compuesta por las sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), en su concentración original (MS), semisólido (agar SIGMA® A-1296, 0.65 %), enriquecido con sacarosa 30 $gr \cdot l^{-1}$ y libre de reguladores del crecimiento. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 con KOH o HCl antes de la adición del agente gelificante; esterilizándose por calor húmedo mediante autoclave a 1.46 $kg \cdot cm^{-2}$ durante 20 minutos. Los cultivos fueron incubados durante 30 días en condiciones de luz ($116 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, PAR, fotoperíodo 14 hs.) y temperatura (27 ± 2 °C) controladas. Al finalizar el experimento se determinó número de semillas/plántulas sin contaminación visible y número de semillas germinadas acumuladas para cada uno de los tratamientos, registrándose diariamente el índice de germinación fisiológica durante 30 días y evaluándose algunos indicadores indirectos de vigor tales como: 1) días de inicio de la germinación (IG); 2) energía germinativa (EG), que corresponde al tiempo transcurrido desde la siembra de las semillas hasta la germinación del 5 % de las semillas sembradas; 3)

índice de velocidad de germinación (IVG) se determinó a partir del empleo de la fórmula desarrollada por Maguire (1962), $IVG = \sum Ci / \sum Ci Ti$, donde Ci representa el número de semillas germinadas por día y Ti el número de días transcurridos desde el inicio del ensayo en que germinan Ci semillas; 4) tiempo medio de germinación en días (TMG) se calculó a partir de la ecuación $TMG = \sum Ci Ti / \sum Ci$.

A los fines prácticos, se consideró una semilla germinada a aquella que exteriorizaba el par de cotiledones y/o una raíz de no menos de 5 mm de longitud.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se evaluó la técnica de rayos X y la Prueba Topográfica por Tetrazolio, con una muestra aleatoria de 300 semillas (tres repeticiones de 100 semillas cada una) visualmente identificada como sanas.

Porcentaje de infección y germinación; e índice de velocidad de germinación (IVG) fueron evaluados estadísticamente con un diseño completamente aleatorizado (factorial $2 \times 3 \times 2$, 2 dosis de PH con 3 tiempo de exposición y 2 dosis de NaOCl) donde se cultivaron 10 semillas por tratamiento, efectuándose tres repeticiones del experimento.

Se realizó análisis de la variancia sobre los datos de Porcentaje de germinación e infección y las medias fueron comparadas entre sí por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($P < 0,05$), para determinar el grado de significancia entre los distintos tratamientos; por medio del INFOSTAT (2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección e incidencia del daño producido por *A. longesuturalis*.

Se detectó una acentuada incidencia de *A. longesuturalis* (Fig. 1) en semillas provenientes de la Reserva Pozo Azul, en donde más del 80% de las semillas presentaron daños tisulares resultantes de su irrupción. Basado en la clasificación desarrollada mediante escisión de frutos, pudo determinarse daños moderados a severos en el 50% de las simientes evaluadas (Fig. 2); mientras que sólo un $18,7 \pm 3,5\%$ de éstas no presentaron daños visibles. Se detectó la presencia del insecto en todos sus estados de crecimiento y desarrollo. Éste resultó un método de clasificación muy útil para las semillas de la especie en estudio, ya que permitió trabajar con un margen más amplio de disponibilidad de germoplasma para la obtención de plantas; pues un problema importante es, no sólo la escasez de información acerca de la conservación *ex situ* de las especies que componen la flora nativa de la Selva Misionera (González *et al.*, 2013) sino también la accesibilidad del material en Bancos de semillas en todo nuestro país; lo que las hace más valiosas aún.



Figura 1: Ejemplar adulto de *A. longesuturalis* en semillas de *C. trichotoma*.

Cabe destacar que la incidencia del género *Amblycerus* afecta a numerosas especies forestales (Herzog Viana et al., 2007), entre ellas, *Prosopis* sp. (Johnson, 1983); *Geoffroea decorticans* (Baldini & Alvarado, 2008); *Cordia alliodora*, *C. gerascanthus*, *Tabebuia crisantha*, *T. rosea* (Salazar et al., 2000); *Guazuma ulmifolia*, *Luehea speciosa* (Arguedas, 1997); *Senna occidentales*, *S. bicapsularis*, *Albizia lebbek* (De la Cruz Pérez, 2009), *Sclerobium* sp. (Araujo Pinto, 2007). En una segunda etapa, con el propósito de establecer un método no destructivo que facilitara la separación de las semillas sin daño visible para ser utilizadas en los

ensayos de germinación, se realizó una prueba de rayos X donde fue posible detectar la presencia/ausencia de daños producidos por el insecto (Fig. 3). Este método ha sido previamente aceptado por ISTA (International Seed Testing Association), como una alternativa válida al ensayo de corte para detectar las semillas vacías y/o dañadas por insectos (Willan, 1991). Asimismo, a través del uso de imágenes radiográficas es posible identificar propiedades estrechamente relacionadas con la viabilidad, el vigor y las características estructurales de la semilla (Pérez García & Pita Villamil, 2001; Alzugaray et al., 2007). Su empleo resultó adecuado para la selección de los frutos sin remoción del pericarpio, pues reveló claramente la incidencia de daño por *A. longesuturalis*, principal factor que afecta la calidad y/o viabilidad de las semillas de *C. trichotoma*. Esta prueba, en general, es efectiva en aquellas semillas forestales que presentan cotiledones voluminosos o frutos como achenios, sámaras o cariopses (Ottone, 1993; Pérez García, 2001; Alzugaray et al., 2007). Para complementar la clasificación de frutos sanos y dañados, se ha realizado la Prueba Topográfica por Tetrazolio (Fig.3), donde se logra apreciar las zonas dañadas de las semillas sin tinción; en contraposición con el método anterior, éste es destructivo y puede no detectar daños menores (Vankus, 1997).

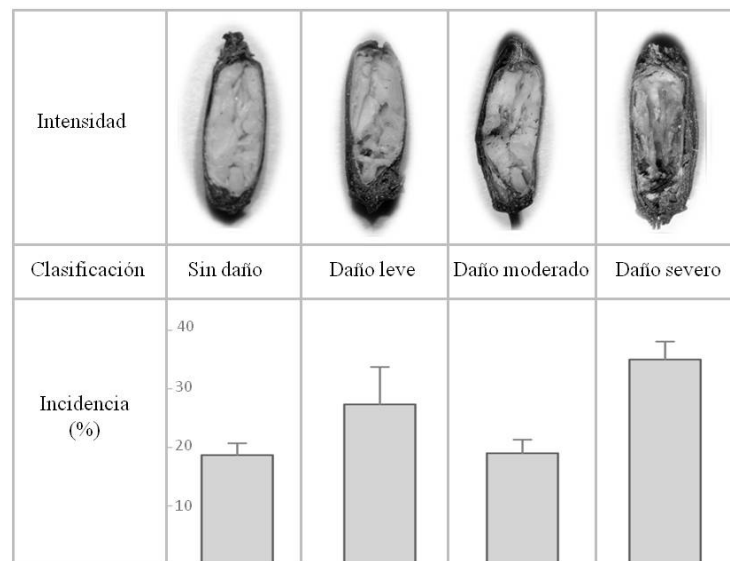


Figura 2: Intensidad, clasificación e incidencia de daños producidos por *A. longesuturalis* en escisión de frutos de *C. trichotoma*. Sin daño, ausencia de lesiones visibles; Daño leve, 25% del tejido dañado en posición opuesta al embrión; Daño moderado, 50% del tejido dañado en posición opuesta al embrión; Daño severo, mayor al 50% del tejido dañado en posición opuesta al embrión.

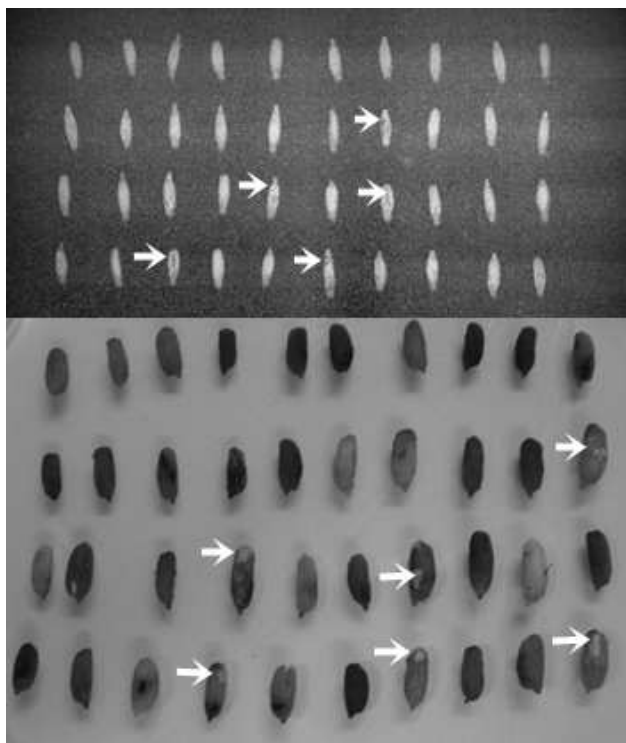


Figura 3: Imagen por rayos X y Prueba Topográfica por Tetrazolio de frutos y semillas de *C. trichotoma*. Las flechas muestran el daño en semillas. La barra indica 1 cm.

En la tabla 1 se presenta la evaluación de la clasificación final de los frutos con la matriz de confusión; los resultados obtenidos muestran que la coincidencia en ambas técnicas es del 100% en frutos sin daños, lo que es considerado como excelente ya que la importancia de esta categorización radica en la aceptación de frutos totalmente sanos para su siembra; mientras que para frutos con daños fue solo del 46%. Si bien no existen antecedentes en la fiabilidad del sistema de diagnóstico por imágenes para frutos y/o semillas de la especie en cuestión; los resultados de nuestro trabajo indican la factibilidad de utilizar la misma en frutos drupáceos favorecidos por el tamaño de sus semillas y el escaso espesor de los cotiledones que permitieron una óptima penetración de la radiación, lo que si bien actuó en desmedro de la calidad de la imagen, posibilitó la obtención de un patrón radiográfico claro y apto para detectar semillas sanas; no así para las que presentaban distintos niveles de daño, lo que hizo que la disponibilidad de germoplasma para la obtención de plantas fuera menor que utilizando la técnica de escisión de frutos.

Tabla 1: Evaluación de la clasificación final del sistema semillas de *Cordia trichotoma* sin daño/con daño.

Clasificación Tetrazolio	Clasificación Rayos X		Coincidencia %
	Sin daño	Con daño	
Sin daño	24	0	100
Con daño	76	35	46

Escarificación, desinfección y germinación *in vitro* de semillas

En la Fig. 4 se observa la tasa de germinación *in vitro* acumulada de semillas de *C. trichotoma* transcurridos 30 días de incubación en las condiciones químicas y físicas descriptas en materiales y métodos. Se pudo observar que en los tratamientos donde se removió el pericarpio y en aquellos donde persistió pero la concentración de NaClO fue mayor (2,5%), presentaron altas diferencias significativas ($P \leq 0,05$); mientras que el uso de una concentración menor del desinfectante (1,5 % de NaClO), no mostró diferencias significativas. La persistencia del fruto restringió el proceso de germinación, el cual únicamente pudo ser revertido mediante el empleo de una correcta combinación de los agentes químicos evaluados. En presencia de una concentración baja de NaOCl, el proceso morfogénico solo fue escasamente promovido mediante la aplicación de un pre-tratamiento prolongado en una solución de H_2O_2 (PH); mientras que el empleo de una mayor concentración de NaOCl sólo fue efectiva cuando se combinó con un tiempo mínimo de exposición (3 días) en una solución acuosa de H_2O_2 (PH) 30%, en donde el $66,7 \pm 3,3\%$ de las semillas que conservaban el pericarpio germinaron brindando una plántula normal (Fig. 5). La remoción del fruto favoreció fuertemente la germinación *in vitro* de *C. trichotoma* como así también los parámetros de vigor evaluados (Tabla 2). En general, el tiempo transcurrido desde la siembra hasta el inicio de germinación (IG), el porcentaje de germinación acumulado diario obtenido al momento en que la tasa de germinación alcanza su valor máximo y el tiempo medio de germinación, disminuyeron notablemente al utilizar semillas desprovistas del pericarpio, incrementando en consecuencia el índice de velocidad de germinación (IVG).

La remoción del pericarpio no sólo ejerce un efecto benéfico sobre los parámetros evaluados por exclusión de una fuente de latencia (Amaral *et al.*, 1998; Fowler, 2001); sino que además, favorece el establecimiento *in vitro* de los cultivos disminuyendo la incidencia de los microorganismos, principalmente hongos, causales de contaminación. En este sentido el test de comparaciones múltiples de media (Tukey, $P \leq 0,05$) reveló diferencias significativas en todos los tratamientos ensayados, pudiendo observarse que el pre-tratamiento de los frutos en una solución acuosa de H_2O_2 (PH) 30% durante 10 días, independientemente de la concentración de NaOCl utilizada, permitió que más del 80% de los explantes no presentaran indicios de contaminación visible (Fig. 6); a la vez que el empleo

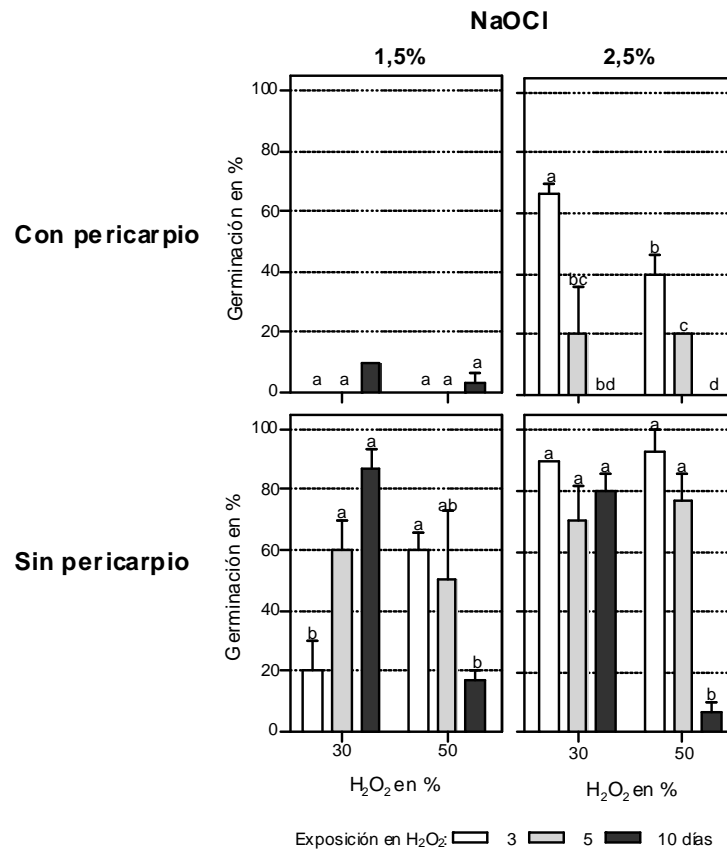


Figura 4: Germinación acumulada transcurridos 30 días de incubación en condiciones *in vitro*. La barra indica el error estándar de la media de tres repeticiones independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$, Test de comparaciones múltiples de Tukey).

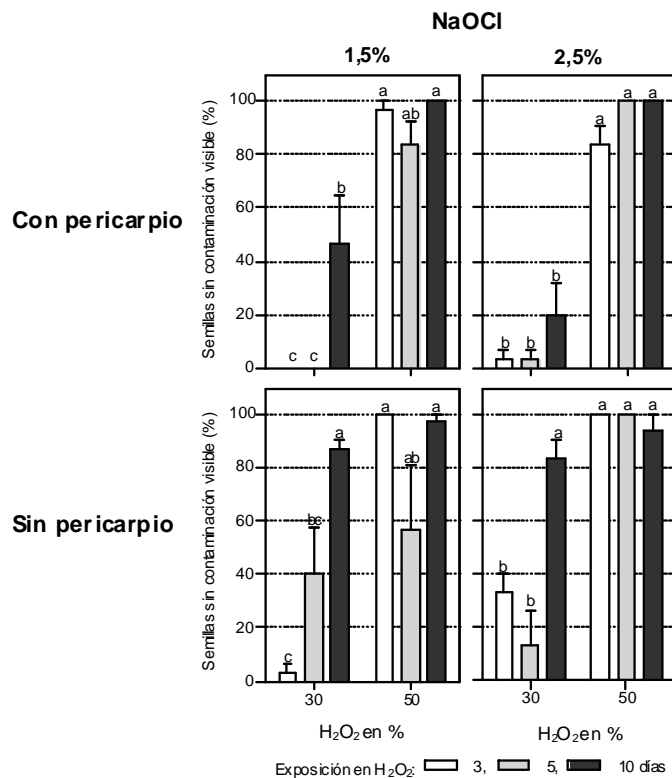


Figura 5: Plántula obtenida mediante la germinación *in vitro* de semillas de *C. trichotoma*.

Tabla 2: Efecto de distintos tratamientos de escarificado y desinfección sobre los parámetros de vigor de semillas de *Cordia trichotoma* cultivadas *in vitro*.

Tratamiento	H ₂ O ₂ (M)	NaClO (%)	IG (días)		TMG (50%)		IVG	
					Pericarpio			
			+	-	+	-	+	-
0,80 x 3 d		1,5	ng	4,3±2,9	ng	5,2±1,4	ng	1,73±0,9
		2,5	ng	1,3±0,6	ng	4,5±0,2	ng	2,1±0,7
1,34 x 3 d		1,5	12 ± 1,7	1,7±0,6	19,3±0,5	5,6±0,1	0,4±0,0	2,1±0,2
		2,5	16,0±1,0	3,0±2,0	23,1±3,7	7,0±0,6	0,2±0,0	1,7±0,7
0,80 x 5 d		1,5	ng	1,7±1,1	ng	3,9±0,6	ng	2,4±0,3
		2,5	ng	1	ng	3,7±0,5	ng	3,2±0,9
1,34 x 5 d		1,5	14,3±13,6	3,3±1,1	17,3±15,0	5,8±2,3	0,1±0,1	0,9±0,6
		2,5	23,3±5,7	1	26,3±3,2	4,8±0,4	0,1±0,0	2,7±0,1
0,80 x 10 d		1,5	22,3±3,5	1	22,3±3,5	3,8±1,8	0,05±0,01	5,13±2,9
		2,5	23±13,3	1	23±13,3	4,4±1,1	0,04±0,03	3,9±0,5
1,34 x 10 d		1,5	ng	2,0±1,7	ng	3,5±2,3	ng	1,1±0,9
		2,5	ng	0,7±0,6	ng	0,7±0,6	ng	0,7±0,6

Figura 6: Efecto de distintos tratamientos desinfectantes sobre el establecimiento *in vitro* de semillas de *C. trichotoma*. La barra indica el error estándar de la media de tres repeticiones independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$, Test de comparaciones múltiples de Tukey).



de una mayor concentración de H_2O_2 (PH), posibilitó la obtención de cultivos libres de contaminantes aún en semillas provistas de pericarpio. El peróxido de hidrógeno ha sido empleado exitosamente en especies del género *Pinus* como promotor de la germinación y antimicrobiano previniendo la proliferación de algunos hongos (Muñoz López et al., 2009; Mas I Gisbert et al., 2011). Su acción desinfectante se centraría en su capacidad de actuar como un agente oxidante enérgico, disociándose en agua y oxígeno molecular, sin dejar residuos tóxicos (Láñez, 1998); a la vez que su propiedad de disminuir la dureza de la testa (escarificación) favorecería la absorción del hipoclorito de sodio u otros desinfectantes que se utilicen en combinación (Mas I Gisbert et al., 2011). Al respecto, la inclusión de NaOCl en los procesos de desinfección es una técnica ampliamente generalizada con una acción comprobada en la eliminación de microorganismos resistentes (bacterias y hongos) debido a la liberación de oxígeno; o bien, por combinación directa del cloro con proteínas enzimáticas y componentes de membranas que provocan su desnaturalización (Mateos, 2004; Flores García et al. 2008).

CONCLUSIONES

-Se hallaron dos métodos efectivos para la selección de semillas sanas/dañadas por el coleóptero *A. longesuturalis*; por un lado el uso de imágenes radiográficas como técnica no destructiva y rápida para el cultivo de frutos con pericarpio y por otro, la técnica de escisión de frutos para clasificar distintos niveles de daño en aquellos desprovistos de pericarpio.

-Es posible inducir la germinación de semillas a partir del cultivo *in vitro* de frutos, mientras que la remoción del pericarpio promueve el proceso y mejora notablemente los indicadores de vigor evaluados.

-Los mejores resultados se obtuvieron cuando los frutos fueron sometidos a un pre-tratamiento de inmersión en una solución acuosa de H_2O_2 (PH) 50% durante 3 días, seguido de transferencia a una solución de NaOCl 2,5% y posterior remoción del pericarpio; en donde, el 93,3±6,7% de las semillas germinan en condiciones *in vitro*, requiriendo el inicio del proceso morfogénico 1,7±0,6 días de incubación, alcanzándose el TMG a los 5,6±0,1 días.

-La combinación de H_2O_2 (PH) y NaOCl permite obtener una óptima desinfección de las semillas para su establecimiento *in vitro*.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Secretaría General de Ciencia y Técnica, UNNE (PI N° 014/10, 005/11) y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICTO N° 0213-2011) por los aportes recibidos. Asimismo, extienden sus agradecimientos a la Dra. Carolina Peichoto por su asesoramiento en aspectos morfo-anatómicos de la especie.

BIBLIOGRAFIA

- Alzugaray, C., N. Carnevale & A. Salinas.** 2007. Evaluación de la calidad de las semillas de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht. y *Schinopsis balansae* Engl. mediante la prueba de rayos X. Revista de Investigación, Facultad de Ciencias Agrarias UNR 11: 51-59.
- Amaral, D., N. Alcalay, & M. Antonio.** 1988. Armazenamento de sementes de quatro espécies florestais do Rio Grande do Sul. In: Anais Congresso Florestal Estadual, 6. Nova Prata. Nova Prata: Prefeitura Municipal de Nova Prata I Meridional. p: 373-397.
- Araujo Pinto, A.** 2007. Avaliação de danos causados por insetos em sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e andirobinha (*C. procera* DC.) (Meliaceae) na Reserva Florestal Adolpho Ducke em Manaus, AM; Brasil. 60 p.
- Arguedas, M.** 1997. Plagas de semillas forestales en América Central y el Caribe. Turrialba, C.R: CATIE. (Serie técnica. Manual técnico N° 25). 120 p.
- Ariza Espinar, L., A. Calviño, E. Di Fulvio & N. Dottori.** 2006. Boraginaceae, parte I. En: Anton, A. y Zuloaga, F. Flora Fanerogámica Argentina 97: 1-55.
- Baldini, A. & A. Alvarado.** 2008. Manual de plagas y enfermedades del bosque nativo en Chile. Asistencia para la recuperación y revitalización de los bosques templados de Chile, con énfasis en los *Nothofagus* caducifolios. FAO/CONAF, Santiago, Chile. 224 p.
- Barrance, A., J. Beer, D.H. Boshier, J. Chamberlain, J. Cordero, G. Detlefsen, B. Finegan, G. Galloway, M. Gómez, J. Gordon, M. Hands, J. Hellin, C. Hughes, M. Ibrahim, D. Kass, R. Leakey, F. Mesén, M. Montero, C. Rivas, E. Somarriba, J. Stewart & T. Pennington.** 2003. Eds. T. Cordero, J.; Boshier, D.H.; Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas. Oxford (RU). OFI/CATIE. 1079 p.
- Belcher, E. & J.A. Vozzo.** 1979. Radiographic Analysis of Agricultural and Forest Tree Seeds. In: Handbook on Seed Testing. Contribution N° 31. Ed. Association of Official Seed Analysts.
- Biloni, J. S.** 1990. Árboles Autóctonos Argentinos. Tipografía Editora Argentina. Buenos Aires. 335 p.
- Cabrera, A.** 1983. Flora de la Provincia de Jujuy. Colección Científica del INTA. Buenos Aires, Argentina. Parte VIII – Clethraceas a Solanaceas. 508 p.
- Crechi, E. A. Hennig, A. Keller, H. Hampel, C. Domecq & B. Eibl.** 2010. Crecimiento de 3 especies latifoliadas nativas a cielo abierto y bajo dosel de pino hasta los 12 años de edad, en Misiones Argentina: *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex Steudel, *Balfourodendron riedelianum* (Engl.) Engl. y *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.). 14^{as} Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Facultad de Ciencias Forestales, UNAM - EEA Montecarlo, INTA. Eldorado, Misiones, Argentina. 8 p.
- De la Cruz Pérez, A.** 2009. Estudio faunístico de Bruquinidos (Coleoptera: Bechidae) en el Estado de Tabasco, México. Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias. Montecillo, Texcoco, México. 89 p.
- de Souza, L.** 2008. Morphology and Anatomy of the *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrab. ex I. M. Johnston diaspore (Boraginaceae). Brazilian Archives of Biology and Technology 51: 761-768.

- De Tempe J.** 1961. Routine methods for determining the health condition of seeds in the seed testing station. Proc. Int. Seed Test. Assoc. 26: 27-60.
- Dimitri, M. J.** 1998. "El nuevo libro del árbol: Especies forestales de la Argentina oriental". Milán Jorge Dimitri, Rosario F. Julio Leonardis y José Santos Biloni. 2da. Edición. Buenos Aires. El Ateneo. Tomo 2: 1-119.
- Fick, T.** 2007. Establecimiento *in vitro* e propagação de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (louro-pardo). Tesis para optar al grado de Master en Ingeniería Forestal de la Universidad Federal de Santa María, RS. Brasil. 63 p.
- Flores García, A., J. Álvarez Moctezuma, J. Rodríguez de la O & A. Corona Ambris.** 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl.. Foresta Veracruzana 10: 27-33.
- Fowler, J.** 2001. Manejo de sementes de espécies florestais. Eds: João Antonio Pereira Fowler, Emerson Gonçalves Martins.- Colombo : Embrapa Florestas, Documentos 58. 76 p.
- González, C.; Eibl, B.; Otegui, M.; Dreyer, N.; Baron, C. & Weinberger, V.** 2013. Conservación de semillas de especies nativas en bancos de Germoplasma. Resumen 4to Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano Iguazú 2013.
- Grattapaglia, D. & M. Machado,** 1998. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L. S. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH. p: 183-260.
- Hampton, J.G. & D.M. Tekrony.** 1995. Handbook of vigour test methods. International Seed Testing Association. Zürich, 117 pp.
- Heberle, M., P. Kielse, D. Bisognin & M. Rauber.** 2010. Estaquia de louro-pardo (*Cordia trichotoma* Vell.). 14^{as} Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Facultad de Ciencias Forestales, UNaM - EEA Montecarlo, INTA. Eldorado, Misiones, Argentina. 7 p.
- Herzog Viana, J., V. Grenha, M. Valverde de Macedo & R. Ferreira Monteiro.** 2007. Predação de sementes de *Senna neglecta* (Leguminosae: Caesalpinoideae) no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PNSO). Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu – MG. p: 1-2.
- Iañes, P.** 1998. Metabolismo energético. In: Curso de microbiología general. Facultad de Ciencia Agrarias. Universidad Nacional del Nordeste. Corriente República, Arg. [Fecha de consulta: 12 de Diciembre 2012]. Disponible en: http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgenera/15_micro.htm
- InfoStat.** 2012. InfoStat v 2012. Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- ISTA (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION).** 1996. Tree and Shrub Seed Handbook. Ed. International Seed Testing Association. Zurich. Switzerland.
- ISTA (INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION).** 2003. ED. Rules for Seed Testing.
- Johnson, C. D.** 1983. Ecología, control e identificación de insectos del nuevo mundo que infestan las semillas de *Prosopis* (Leguminosae). Manual sobre insectos que infestan la semilla de *Prosopis*. FAO, Roma. 59 p.
- Johnson, C., J. Romero & E. Raimúndez-Urrutia.** 2001. Ecology of *Amblycerus crassipunctatus* Ribeiro-Costa (Coleoptera: Bruchidae) in seeds of Humiriaceae, a new host family for Bruchids, with an ecological comparison to other species of *Amblycerus*. The Coleopterists Bulletin 55: 37-48.
- Maguire, J.** 1962. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Sci. 2: 176-177.
- Mas I Gisbert, H., E. Pérez-Laorga Arias, M. Pitxer, P. Veintimila & E. Campos.** 2011. Influencia del tratamiento por inmersión en peróxido de hidrógeno para el control químico de *Fusarium circinatum* en la viabilidad y el almacenamiento de las semillas del género *Pinus*. Acta de II Reunión de Sanidad Forestal de la Sociedad Española de Ciencias Forestales. 20 p.
- Mateos, P.** 2004. Control de las poblaciones microbianas: Esterilización y desinfección. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Salamanca. [Fecha de consulta: 12 de Diciembre 2012]. Disponible en: <http://www.atl-gestion.com/Asepsia%20y%20desinfeccion.htm#ancho141391>.
- Mendonça, E., N. Ramos & R. Paula.** 2001. Viabilidade de sementes de *Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel (Louro-pardo) pelo teste de Tetrazólio. Revista Brasileira de Sementes, vol. 23, nº 2, p.64-71.
- Muñoz López, C., E. Cuervo Sánchez, M. Ampudia Díaz, A. Gastón González, J. Peñuelas Rubira, S. Iglesias Sauce & N. Herrero Sierra.** 2009. Control químico de *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell en semillas del género *Pinus*. 5º Congreso Forestal Español. Ref: 5CFE01-503. 12 p.
- Murashige, T. & F.A. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Muruaga de L'Argentier, S.** 1983. Observaciones sobre Bruchidae (Coleoptera) del noroeste argentino. V. Estudios morfológicos y biológicos de *Amblycerus longesuturalis* (Pic). Acta Zoologica Lilloana 37 (1):91-100.
- Ottone, J.** 1993. Árboles forestales. Prácticas de cultivo. Ed. Agro Vet. S.A, Buenos Aires. 573 p.
- Pérez García, F. & J. Pita Villamil.** 2001. Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Eds: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. España. ISBN: 84-491-0503-X. 16 p.
- Pérez-Moreau, R.** 1994. Boraginaceae. En: R.L. Pérez-Moreau (ed.), Flora Chaqueña, Vol. 8: 3-11. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires.
- Ramallo Carvalho, P.** 2002. Louro Pardo. EMBRAPA, Circular técnica 66. 16 p.
- Rao, N.K., J. Hanson, M.E. Dulloo, K. Ghosh, D. Nowel & M. Larinde.** 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioversity International, Roma, Italia. 182 pp.
- Salazar, R., C. Soihet, & J. Méndez.** 2000. Manejo de semillas de 100 especies forestales de América Latina. CATIE. Proyecto de Semillas forestales: Danida Forest Seed Centre. 1: 155-156. ISBN: 9977-57-349-2. Turrialba, Costa Rica.
- Simak, M.** 1980. X- radiography in research and testing of forest tree seeds. Rapporteur, Dept. of Silviculture, Swedish University of Agricultural Sciences, 3: 1- 34.

Vankus, V. 1997. The Tetrazolium Estimated Viability Test for Seeds of Native Plants. In: Landis, T.D.; Thompson, J. R., tech. coords. National Proceedings, Forest and Conservation Nursery Associations. Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-419. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station: 57-62.

Disponible en: <http://www.fcnanet.org/proceedings/1997/vankus.pdf>.

Willan, R. L. 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales: con especial referencia a los trópicos. [En línea] Roma: FAO. [Estudio FAO Montes 20/2] 502 p. ISBN 92-5-302291-4. [Consultado: 22/11/2012]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/AD232S/ad232s00.htm>.